

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 5 月 17 日 (17.05.2001)

PCT

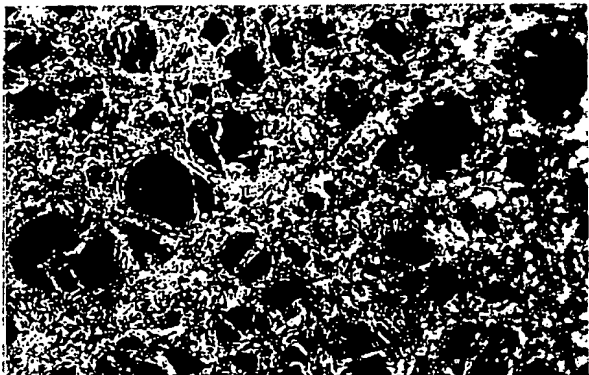
(10) 国際公開番号  
WO 01/34214 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61L 15/00, 27/00 (72) 発明者; および  
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05564 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 姫田 康一  
(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 18 日 (18.08.2000) (HIMEDA, Yasukazu) [JP/JP]. 梅田 俊彦 (UMEDA, Toshihiko) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市旭町3  
(25) 国際出願の言語: 日本語 丁目5番1号 電気化学工業株式会社 中央研究所内  
(26) 国際公開の言語: 日本語 Tokyo (JP).  
(30) 優先権データ: (74) 代理人: 泉名 謙治, 外 (SENMYO, Kenji et al.); 〒  
特願平11/318587 1999 年 11 月 9 日 (09.11.1999) JP 101-0042 東京都千代田区神田東松下町38番地 鳥本  
特願2000/39244 2000 年 2 月 17 日 (17.02.2000) JP 鋼業ビル Tokyo (JP).  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 電 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
気化学工業株式会社 (DENKI KAGAKU KOGYO BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒100-8455 東京都千 101-0042 東京都千代田区神田東松下町38番地 鳥本  
代田区有楽町1丁目4番1号 Tokyo (JP). UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[続葉有]

(54) Title: USE OF SOLUBLE CELLULOSE DERIVATIVE HAVING BEEN MADE HARDLY SOLUBLE IN WATER AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の用途及びその製造方法



(57) Abstract: (1) A medical material for coating tissues comprising a soluble cellulose derivative having been made hardly soluble in water which is to be embedded in the body or applied to tissues; and (2) a process for producing the medical material for coating tissues as described in (1) characterized in that a soluble cellulose derivative is made hardly soluble in water by freezing and thawing an acidic solution.

(57) 要約:

(1) 水難溶性化した可溶性セルロース誘導体からなる、体内へ埋め込む又は組織に貼付する目的で使用するための組織被覆性医療材料、および (2) 水難溶性化する方法として、可溶性セルロース誘導体の酸性溶液の凍結・解凍を用いることを特徴とする (1) 記載の組織被覆性医療材料の製造方法が提供される。

WO 01/34214 A1



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の用途及びその製造方法

#### 技術分野

(1) 組織治癒を補助・促進する目的で使用するために癒着防止材や創傷被覆材として用いる、化学的架橋剤やその他の化学的修飾剤を一切使用せずに可溶性であるセルロース誘導体を酸処理する事により得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体で形成された組織被覆性医療材料と(2) 可溶性セルロース誘導体の酸性水溶液を凍結解凍させることにより得られる組織被覆性医療材料を提供するための製造方法に関するものである。

#### 背景技術

可溶性セルロース誘導体は、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース等が知られている。その中でカルボキシメチル基が導入されたカルボキシメチルセルロース(以後、一般的呼称に準じてカルボキシメチルセルロースはカルボキシメチルセルロースナトリウムを指す)は代表的なものであり、その粘弾性を利用して食品分野や吸水材等で広く利用されており、その用途は医療分野にも及んでいる。

医療分野へのカルボキシメチルセルロースの応用に関しては、カルボキシメチルセルロース水溶液やそれを乾燥させて成形したものを用いた癒着防止材としての効果確認に関する報告がなされているが、十分な効果は得られていない(American Journal of Surgery, Vol. 169, 154-159(1995))。特開平1-301624号や米国特許第5906997号等には化学的架橋剤又は化学的修飾剤を用いたカルボキシメチルセルロース組成物の癒着防止材が開示されており、また特表平5-508161号、特表平6-508169号を基に開発されたヒアルロン酸とカルボキシメチルセルロースをカルボ

ジイミドで修飾したものからなる組成物でフィルム状の癒着防止剤「セプラフィルム」（Genzyme社製）が市販されている。

しかしながら、実質的に改質されていない水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを癒着防止材に用いる例は見当たらない。

創傷被覆剤について見てみると、特開平 1 1 - 3 2 2 6 1 5 号にはカルボキシメチルセルロースとフィブリン、特開平 7 - 1 0 9 2 2 0 号にはカルボキシメチルセルロースと各種消毒剤、独国特許第 1 3 9 7 8 9 3 号にはカルボキシメチルセルロースと抗炎症剤からなる創傷治癒剤が開示されている。また、特表平 8 - 5 0 5 2 5 8 号や欧州特許第 4 7 6 4 7 号では架橋されたカルボキシメチルセルロースを用いた創傷被覆剤が開示されている。これらはいずれも可溶性であるカルボキシメチルセルロース又は化学的架橋剤等で架橋されたカルボキシメチルセルロースを用いており、癒着防止材の場合と同様に改質されていない水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの創傷被覆剤用途は開示されていない。

一方、骨修復を目的として用いられるブロック状の充填材としては、例えば、特開昭 6 2 - 3 9 5 0 6 号には薬剤によりキチンを架橋した多孔質スポンジが開示されており、特開平 3 - 2 3 8 6 4 号にはコラーゲンスポンジとポリ乳酸からなるブロック状の複合材料が、また特表平 7 - 5 0 5 6 4 3 号はヒアルロン酸エステルからなる生体適合性と生体吸収性を有する優れた骨置換剤が開示されている。しかしながら、多孔質スポンジは生体内で非吸収性であるため骨自身に完全に置換されないので、感染の危険性および材料自体が離脱してしまう危険性があり、またコラーゲンを用いる場合にはアテロコラーゲンに若干の抗原性があるという不具合があった。

その他薬剤担体（Pharm. Develop. Tech., Vol. 4, 55-63(1999)）、細胞培養基材（J. M. S. - Pure Appl. Chem., Vol. A33, 1875-1884(1996)）、ポリペプチド増殖因子含有ゲル組成物（米国特許第 5 7 0 5 4 8 5 号）等が報告または開示されているが、いずれの場合においても用いられるカルボキシメチルセルロースは本発明によるものとは異なるものである。

これまで、例えばカルボキシメチルセルロースの粘弾性等の材料特性を向上させるために特開平10-251447号記載のグリオキサールによる化学架橋カルボキシメチルセルロース、特開昭63-37143号記載の多価金属イオンとの混合をおこなったカルボキシメチルセルロースゲル、特開平7-090121号記載の二価、又は三価金属塩によるカルボキシメチルセルロースゲル、さらには特開平11-106561号記載の塩基性酢酸アルミニウムの添加によるカルボキシメチルセルロースゲルなどが考案されている。しかし、こうした修飾カルボキシメチルセルロースは、化学架橋剤の使用や金属イオンが添加がされており、医療品として用いる場合には安全性の観点からこれらを含まない材料が望まれていた。

水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの取得方法には、カルボキシメチルセルロースの酸性溶液を静置する方法（Encyclopedia of Polymer Science & Technology, Vol. 3, 520-539(1965)）、粒状のカルボキシメチルセルロースにメチルアルコールやエチルアルコール存在下で強酸を添加する方法（Colloid Polym. Sci., Vol. 267, 226-236(1989)）、強イオン性陽イオン交換樹脂を用いる方法（米国特許第2617800号）等が挙げられる。またカルボキシメチルセルロースの酸性溶液を超遠心処理等により濃縮する方法も用いることができる。しかしこれらの方法は、水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得るまでの操作性、時間や収量、また得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースをシート状、フィルム状、スポンジ状あるいはチューブ状等に成形し難いという問題があった。

本発明者らは、上記目的を達成するために、可溶性セルロース誘導体自体の物理化学的性質と生体に対する効果を鋭意検討してきた。その結果、従来より報告等がなされている酸処理によって得られる水難溶化した可溶性セルロース誘導体が癒着防止材や創傷被覆材等の組織被覆性医療材料として高い効果を持つことを見出した。また、特にこれまで検討されてこなかった可溶性セルロース誘導体水溶液を酸性条件下で凍結・解凍する手法により製造される材料が、凍結時に形成される氷晶の効果で繊維状またはフィル状微

細構造を有することを見出した。凍結解凍により得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体は、従来から知られている酸処理法により調製された水難溶性化した可溶性セルロース誘導体と比較して、シート状、フィルム状、スポンジ状等の成形が容易であるばかりでなく、超音波やミキサー等を用いて破碎状とした後にシート状、フィルム状、チューブ状等にも成形し易くかつ均一な形態のものが得られるなど、医療材料として優れた材料特性を有するものであること明らかにした。

更に、生体用途への適応性に関しては、重要な物性である溶解性を制御でき、制御したものの中から非常に高い癒着防止効果と生体適合性を有する候補を見出すことができ、本発明を完成させるに至った。

#### 発明の開示

すなわち本発明は、(1)水難溶性化した可溶性セルロース誘導体からなる、体内へ埋め込む又は組織に貼付する目的で使用するための組織被覆性医療材料、(2)水難溶性化する方法として、可溶性セルロース誘導体の酸性溶液の凍結・解凍を用いることを特徴とする(1)記載の組織被覆性医療材料の製造方法、(3)可溶性セルロース誘導体濃度を5質量%以上になるように酸溶液と混和し、非凍結温度下で放置することにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする(1)記載の組織被覆性医療材料、(4)可溶性セルロース誘導体の酸性溶液を静置することにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする(1)記載の組織被覆性医療材料、(5)可溶性セルロース誘導体の酸性溶液と極性有機溶媒を混合することにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする(1)記載の組織被覆性医療材料、(6)陽イオン交換カラムに可溶性セルロース誘導体溶液を通液させることにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする(1)記載の組織被覆性医療材料、(7)可溶性セルロース誘導体の酸性溶液を濃縮することにより得られる水難溶性化した可溶

性セルロース誘導体を用いることを特徴とする（１）記載の組織被覆性医療材料、（８）可溶性セルロース誘導体からなり、実質的には化学的架橋剤または化学的修飾剤等により改質されていない（１）記載の水難溶性化した可溶性セルロース誘導体、（９）水難溶性化した可溶性セルロース誘導体が繊維状またはフィルム状構造を有することを特徴とする請求項１又は２記載の組織被覆性医療材料、（１０）中性の６０℃の水溶液中で３時間での可溶性セルロース誘導体の溶解率が５０％以下であることを特徴とする（１）記載の組織被覆性医療材料、（１１）水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の溶解性を制御することを特徴とする（２）記載の組織被覆性医療材料の製造方法、（１２）水難溶性化した可溶性セルロース誘導体とヒアルロン酸又はヒアルロン酸塩を除く他の高分子からなることを特徴とする（１）記載の組織被覆性医療材料、（１３）可溶性セルロース誘導体がカルボキシメチルセルロースである（１）～（１２）のいずれかに記載の可溶性セルロース誘導体、（１４）組織被覆性医療材料が癒着防止材であることを特徴とする（１）又は（１２）記載の組織被覆性医療材料、（１５）組織被覆性医療材料が創傷被覆材であることを特徴とする（１）又は（１２）記載の組織被覆性医療材料、（１６）組織被覆性医療材料が骨再生用被覆材であることを特徴とする（１）又は（１２）記載の組織被覆性医療材料である。

#### 図面の簡単な説明

図１は、凍結解凍処理により得られる水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを示し、図２は、酸性水溶液熟成処理より得られる水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する

本発明でいう体内へ埋め込むまたは組織に貼付するとは、生体内の粘膜、血管、骨、腱のような組織や胃あるいは腸のような臓器、または体表面の皮

膚や粘膜に適用することを意味する。例えば、一般的な手術の際に引き起こされる外科的損傷、骨折、アキレス腱断裂や床ずれ等に見られる物理的損傷あるいは化学薬品による火傷等の化学的損傷に対して適用することを指す。また組織被覆性医療材料とは、体内、体外を問わず損傷あるいは障害を受けた組織または臓器を被覆する際に用いる生体適合性の材料であることを意味する。

本発明では可溶性セルロース誘導体としてメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース等を用いることができるが、工業レベルでの入手が容易であり安価であるカルボキシメチルセルロースが最も好ましい。

本発明に用いられる可溶性セルロース誘導体の分子量は、特に規定されるものではないが、約  $1 \times 10^4$  ～ 約  $5 \times 10^5$  ダルトンの範囲内のものが好ましい。

また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等をして得たものでも同様に好ましく使用できる。また、可溶性セルロース誘導体のもうひとつのパラメーターであるエーテル化度については、以下の処理で水難溶性化が起こる範囲のものが利用できる。

なお、本発明にいう可溶性セルロース誘導体は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

本発明にいう改質とは、本来、水溶性である可溶性セルロース誘導体を水難溶性とするために化学的架橋を導入したり化学的修飾を行ったりすることを意味する。

本発明にいう溶解性を制御するとは、以降の実施例で説明するように、60℃のpH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水中に水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を置くと、一定時間後にリン酸緩衝生理食塩水中に溶出してくる可溶性セルロース誘導体の割合を変えることを意味する。

凍結解凍法による可溶性セルロース誘導体の製造について述べる。可溶性



セルロース誘導体の水溶液のpHを調整するために使用する酸は、pH 3.5以下に調整できる酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。なお、酸性水溶液のpHは用いる可溶性セルロース誘導体の分子量、エーテル化度、目的とする水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の物性等から選ばれるが、さらに好ましくはpH 2以下である。

凍結、解凍は可溶性セルロース誘導体の調整された酸性水溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終わった後、所定の温度で解凍させる操作を少なくとも1回行う。凍結、解凍の温度と時間は、容器の大きさ、水溶液量により可溶性セルロース誘導体の酸性水溶液が凍結、解凍する温度と時間の範囲内で適宜決められるが、一般には、氷点以下の凍結温度、氷点以上の解凍温度が好ましい。

凍結、解凍時間を短くできることから、更に好ましくは $-5^{\circ}\text{C}$ 以下の凍結温度、 $5^{\circ}\text{C}$ 以上の解凍温度が選ばれる。また、時間は、その温度で凍結、解凍が終了する時間以上であれば特に制限されない。

可溶性セルロース誘導体の調整された酸性水溶液を凍結し、次いで解凍する操作の繰り返し回数は、使用する可溶性セルロース誘導体の分子量、水溶液濃度、水溶液のpH、凍結及び解凍の温度と時間、並びに生成する水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の強さ等の諸特性により適宜決められる。通常は1回以上繰り返すことが好ましい。また、凍結、解凍の操作を繰り返すごとに、その凍結、解凍の温度及び時間を変えても構わない。

得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の溶解性は、用いる可溶性セルロース誘導体の分子量、水溶液のpH、凍結温度と時間等を適宜選択することにより制御することが容易である。例えば、換算分子量 $1.28 \times 10^5 \sim 1.35 \times 10^5$ ダルトンのカルボキシメチルセルロースナトリウムを蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液のpHを1.5とし、これを $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結、室温で解凍した場合、凍結時間が長いほど溶解しにくい水難溶性化したカルボキシメチルセルロースが得られる。

また、同濃度で調製した分子量の異なるカルボキシメチルセルロースナトリウムの pH 1.5 の水溶液を -20℃ で一定時間凍結し、さらに室温で解凍した場合、カルボキシメチルセルロースナトリウムの分子量が大きいほど溶解しにくい水難溶性化したカルボキシメチルセルロースが得られる。

さらに、カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液の pH だけを変化させ、pH 1.5 及び pH 2 の場合を比較してみると、pH が低い方が水難溶性化したカルボキシメチルセルロースが溶解しにくい。

次に、可溶性セルロース誘導体を 5 質量% 以上の濃度で酸溶液と混合する方法について述べる。混合に供する酸は、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。混合・放置は、可溶性セルロース誘導体と酸溶液とを、任意の容器に入れた後、十分に均一になるまで混合し、混合が終わった後、所定の温度で放置させる操作を少なくとも 1 回行う。混合、放置の温度と時間は、容器の大きさ、容量により適宜決められるが、一般には、室温以下の混和温度が好ましい。また放置時間は、これらの操作が完了する時間以上であれば特に制限されない。

次に、他の製造法による水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の製造法について述べる。従来より知られている可溶性セルロース誘導体酸性溶液を放置する方法では、可溶性セルロース誘導体を水に溶解し、この水溶液に例えば塩酸、硝酸、硫酸等を添加して酸性化する方法、酸溶液に可溶性セルロース誘導体を溶解する方法等可溶性セルロース誘導体の酸性水溶液が得られる方法であればいずれの方法を用いることができる。

酸性溶液中の可溶性セルロース誘導体の濃度は特に制限されないが、粘性を有する溶液となることから好ましくは 5 質量% 以下、さらに好ましくは 1 質量% 以下である。酸性水溶液の pH は用いる可溶性セルロース誘導体の分子量、エーテル化度、目的とする水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の物性等から選ばれるが、好ましくは pH 3.5 以下であり、さらに好ましくは pH 2 以下である。

調製した可溶性セルロース誘導体の酸性溶液を静置することにより水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を得られるが、静置する時間は酸性溶液のpHと同様に用いる可溶性セルロース誘導体の分子量、エーテル化度、目的とする水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の物性等から選ばれる。

また、静置する際の温度は上記の操作が完了する温度であれば特に制限されないが、一般には室温以下が好ましく、さらに好ましくは5℃以下で可溶性セルロース誘導体酸性水溶液が凍結しない温度である。

水難溶性化した可溶性セルロース誘導体は、また可溶性セルロース誘導体の酸性水溶液とメタノール、エタノール等の極性有機溶媒を混合することにより取得することができる。酸性溶液中の可溶性セルロース誘導体の濃度は特に制限されないが、好ましくは5質量%以下、さらに好ましくは1質量%以下である。またそのpHは用いる可溶性セルロース誘導体の分子量、エーテル化度、目的とする水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の物性等から選ばれるが、好ましくはpH 3.5以下であり、さらに好ましくはpH 2以下である。

極性有機溶媒とは、水と完全に相溶し、かつ、その極性有機溶媒と水との混合溶媒が可溶性セルロース誘導体を室温又は室温以上の温度で溶解し、溶液を形成することができる極性を有する水溶性有機化合物を意味する。

本発明に用いる極性有機溶媒は、水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を取得できるものであれば特に制限されないが、メタノール、エタノール等の低級アルコール系溶媒、グリセリンやエチレングリコール等の多価アルコール系溶媒、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒、ホルムアミド、N, N-ジメチルホルムアミド等のアミド系溶媒、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロチオフェン-1等のスルホキシド系溶媒、ヘキサメチルホスホリクトリアミド等のリン酸アミド系溶媒、アセトニトリル等を使用することができる。該極性有機溶媒は、1種類のみを使用してもまたは2種類以上を併用してもよい。

これらの極性有機溶媒は一度に添加してもよく、また水難溶性化した可溶

性セルロース誘導体を回収した後の酸性溶液にさらに添加してもよく、添加方法について何ら制限されるものではない。また、可溶性セルロース誘導体を酸性水溶液を調製し、該水溶液に極性有機溶媒を適量添加してもよいが、極性有機溶媒と水との混合溶媒中に可溶性セルロース誘導体の粉末を直接溶解させた後に溶液を酸性化しても構わない。

可溶性セルロース誘導体水溶液を陽イオン交換カラムに通液する方法では、例えば強イオン性陽イオン交換樹脂を充填したカラムを用いる。可溶性セルロース誘導体濃度は可溶性セルロース誘導体の分子量、エーテル化度等により選択されるが、好ましくは1質量%以下であり、さらに好ましくは0.5質量%以下である。

用いるイオン交換樹脂は可溶性セルロース誘導体のナトリウムを水素と交換できる能力を有するものであれば特に制限されないが、スルホン基を有する強イオン性陽イオン交換樹脂が好ましい。

可溶性セルロース誘導体の酸性水溶液を濃縮する場合には、濃縮方法として超遠心分離、通風乾燥、減圧乾燥、凍結乾燥などがあげられる。濃縮前の酸性水溶液中の可溶性セルロース誘導体濃度は、一般的には、扱いやすいと言う点で5質量%以下が好ましく、さらには1質量%以下がより好ましい。

次に、医療材料として適応する場合の水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の成形加工等について述べる。まず、生体に適応するために用いた酸を除去・洗浄する操作を行うことが必要である。酸の除去は、中性緩衝液による水難溶性化した可溶性セルロース誘導体周囲の液の置換により行い、更に緩衝液成分の混入が不都合になるならば精製水による置換を行い、水難溶性可溶性セルロース誘導体を得る。用いる中性緩衝液は水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の機能を損なわないものであれば特に制限はないが、例えば薬理学的に許容されるリン酸緩衝液が用いられる。

また、中和方法は特に制限はないが、通常は、バッチ法、濾過法、カラム等に充填して通液する方法等が用いられる。これらの中和条件は、中和液量、回数等を含めて、酸性に調製するために用いた酸等の成分を中和できる条件

であればよく、水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の形態や用途により適宜選択することが可能である。

このようにして得られた水難溶性化した可溶性セルロース誘導体は、その使用目的に応じて、溶媒中に浸漬した状態、溶媒を含ませた湿潤状態、通風乾燥、減圧乾燥あるいは凍結乾燥等の処理を経た乾燥状態で供される。

水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の成形加工等の処理は、作製時には、可溶性セルロース誘導体及び調製された可溶性セルロース誘導体酸性水溶液の容器や手法の選択によりシート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、及びチューブ状の所望の形態の水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の作製が可能である。水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の作製後の加工としては、機械的粉碎による微細な破碎状や圧延によるフィルム化、紡糸等が可能である。

凍結解凍法について見てみると、凍結時に例えば角形または円形の容器を用いることにより角形または円形のシート状、フィルム状、スポンジ状等の水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を得ることができる。また一度得られた水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を蒸留水や生理食塩水等の中でミキサー等により破碎し水難溶性化した可溶性セルロース誘導体懸濁液状態としたり、懸濁液を種々の容器中で乾燥させ、シート状、フィルム状、塊状等とすることも可能である。さらに、凍結解凍法による水難溶性化した可溶性セルロース誘導体は、繊維状またはフィルム状の構造を有することから、その懸濁液を水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を捕らえるに十分な細孔を有するフィルター等の上に展開し、これを乾燥することにより均一なシート状、フィルム状に成形することも容易である。

さらに本発明による水難溶性化した可溶性セルロース誘導体に高分子化合物を混合して用いることができる。高分子化合物は、天然高分子化合物、合成高分子化合物、水溶性高分子化合物、非水溶性高分子化合物を問わず用いることができ、組織への炎症性や障害性等の有害作用を有さないものであれば何ら制限されるものではない。これらは水難溶性化した可溶性セルロー

ス誘導体を調製する際に可溶性セルロース誘導体の酸性溶液中に混合させてもよく、あるいは調製された水難溶性化した可溶性セルロース誘導体と混合してもよく、可溶性セルロース誘導体の水難溶性化を妨げない方法であれば特に制限されない。

混合して用いられる高分子化合物の代表例としては、多糖類、蛋白質、核酸類、及び合成高分子類からなる群から選択されるがこれにより何ら制限されないものである。

多糖類の例としては、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸塩を除くグリコサミノグリカン類（ヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸等）、コンドロイチン硫酸塩（コンドロイチン-6-硫酸等）、ケラチン硫酸塩、アルギン酸及びその生物学的に受容な塩、セルロース、キチン、キトサン、デキストラン、澱粉、アミロース、ポリ乳酸、カラギーナン等が挙げられる。

また、蛋白質の例としては、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、エラスチン、種々のグロブリン、カゼイン、グルテン等、及びそれらの生物学的に受容な合成誘導体等が挙げられる。

また、合成高分子の例としては、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリグルコール酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリ乳酸、それらのコポリマー、及びアクリル酸もしくはメタクリル酸ポリ（ヒドロキシエチル）エステル、ポリアクリルアミド等、ポリビニルアルコール、マレイン酸やフマル酸のコポリマー等のような誘導体等が挙げられる。

なお、本発明は、これらの高分子化合物に何ら制限されないものである。

次に、医療用具として必要な滅菌処理について述べる。可溶性セルロース誘導体の糖鎖構造は熱や放射線等に比較的安定であるために、水難溶性化した可溶性セルロース誘導体からなる組織被覆性医療材料には $\gamma$ 線滅菌、電子線滅菌、エチレンオキサイドガス滅菌、プラズマガス滅菌などの種々の滅菌方法が採用できる。こうした過酷な処理により水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の溶解性が変化する現象が確認されるが、凍結解凍法における凍結時間などの製造条件を変化させてあらかじめより安定な材料を製造して

おき、生体内での貯留性を制御することも可能である。

次に、本発明の医用材料のうち癒着防止材について説明する。

本発明で得られた水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の癒着防止材は、シート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、塊状、繊維状、流動状又はチューブ状等の形態で外科手術に用いることができる。用いられる形態としては、フィルム状又はシート状として外科手術部位に直接貼付するのが好ましく、または、微細破砕状、流動状として注射器等で外科手術部位に塗布するのが好ましい。また、腹腔鏡の手術にも使用することができる。

次に、本発明の医療材料のうち創傷被覆材について説明する。

本発明で得られた水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の創傷被覆材は、シート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、塊状、繊維状、流動状又はチューブ状等の形態で用いられる。用いられる形態としては、フィルム状又はシート状として患部に直接貼付するのが好ましいが、創傷の形状や大きさ等により適宜選択することができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明する。なお、本発明はこれらにより限定されるものではない。

#### 実施例 1

25℃での1%粘度が150～250 mPa・sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62～0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5 \sim 1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解した。こうして調製された水溶液のpHを1N硝酸で1.5に調整し、酸性水溶液15mlを30mlのポリスチレン製容器に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25℃で解凍した。その後、水及び100mM濃度のリン酸緩衝液（pH6.8）により中和を行い、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。この水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを凍結乾燥することにより約1.5mg/cm<sup>2</sup>を含むシート状とした。

#### 実施例 2

実施例 1 で用いたカルボキシメチルセルロースを 20 質量%になるように 1 N 硝酸と室温で混和した後、3 日間 4℃の冷蔵庫で保管した。その後水及び 100 mM 濃度のリン酸緩衝液 (pH 6.8) により中和を行い、塊状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。この水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを約 30 N/cm<sup>2</sup> の圧力をかけて延伸し、さらに約 50℃で乾燥することにより約 1.5 mg/cm<sup>2</sup> を含むフィルム状とした。

#### 実施例 3

実施例 1 で用いたカルボキシメチルセルロースを蒸留水に 1 質量%になるように溶解した。こうして調製された水溶液の pH を 1 N 硝酸で 1.0 に調整し、酸性水溶液 3 リットルを 4 リットルの容器に入れ、40 日間 4℃の冷蔵庫で保管した。析出した水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを遠心分離により回収し、水及び 100 mM 濃度のリン酸緩衝液 (pH 6.8) により中和を行い、塊状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。この水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを生理食塩水に懸濁し、ポリスチレン製容器内にキャストした後約 50℃で乾燥することにより約 1.5 mg/cm<sup>2</sup> を含むフィルム状とした。

#### 実施例 4

実施例 1 で用いたカルボキシメチルセルロースを蒸留水に 1 質量%になるように溶解した。水溶液の pH を 1 N 硝酸で 1.0 に調整し、ジメチルスホキシドが 5 質量%となるように添加した。この溶液 100 ml を 200 ml のガラスビンに入れ、10 日間 4℃の冷凍庫で保管し、きめの細かい粒状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。水及び 100 mM 濃度のリン酸緩衝液 (pH 6.8) により中和を行なった後に、この水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを生理食塩水に懸濁し、ポリスチレン製容器内にキャストした後約 50℃で乾燥することにより約 1.5 mg/cm<sup>2</sup> を含むフィルム状とした。

#### 実施例 5



実施例 1 で用いたカルボキシメチルセルロースを蒸留水に 0.3 質量% になるように溶解した。TSKgel SP ー トヨパール 550 を充填した内径約 5 cm、長さ約 15 cm のガラス製カラムに充填し、0.5 mmol/l リン酸により平衡化した。調製したカルボキシメチルセルロース溶液を液体クロマトグラフ用ポンプ P-500 を用いてイオン交換カラムに注入し、0.5 mmol/l リン酸を 0.5 ml/分の流速で通液し、粘性のある水難溶性化したカルボキシメチルセルロース溶液を得た。水及び 100 mM 濃度のリン酸緩衝液 (pH 6.8) に対して十分に透析を行った後に得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロース溶液をポリスチレン製容器に入れ、凍結乾燥により約 1.2 mg/cm<sup>2</sup> を含むシート状とした。

#### 実施例 6

実施例 1 で用いたカルボキシメチルセルロースを蒸留水に 2 質量% になるように溶解した。この水溶液の pH を 1 N 硝酸で 1.5 に調整し、酸性水溶液 15 ml を 30 ml の容器に入れ、80 °C に設定した減圧乾燥で乾燥し、フィルム状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。この水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを水及び 100 mM 濃度のリン酸緩衝液 (pH 6.8) により中和した後に再度約 50 °C で乾燥することにより約 1.8 mg/cm<sup>2</sup> を含むフィルム状とした。

#### 実施例 7 ラット盲腸擦過モデルにおける癒着防止試験

##### 癒着誘導法

ラット (SD、メス、9 週齢以上) に麻酔剤 (ケタミン溶液) を筋注し麻酔後、仰向けに固定してイソジンにて腹部皮膚を消毒後、剪毛を行った。ラット腹筋を正中線に沿って開腹し、盲腸を腹腔内から取りだし、盲腸を有孔 (φ 1.6 mm) テフロンシートで固定した。孔から露出した盲腸部分にガーゼをかぶせた回転棒 (φ 1.3 mm) を押し当て約 120 回擦過した (片面 2 カ所)。擦過部に実施例 1 から 6 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロース約 4 cm × 4 cm 片をあて、盲腸を元に戻して縫合を行った。また、癒着防止材を適用せず、そのまま盲腸を戻したものをコントロールとした。

こうした処置はコントロールを含めた各実験で7～10匹ずつのラットを用いた。術後一週間程度で剖検し、以下の判定基準(Fertility and Sterility 66, 5, 814-821)によりスコアリングを行い、癒着防止効果を評価した。結果を表1に示す。

#### 判定基準

- 0：癒着無し
- 1：容易に確認できる面を持つフィルム状の癒着
- 2：自由に剥離できる面を有する軽い癒着
- 3：面の剥離が困難な中程度の癒着
- 4：剥離不可能な面を有する密集した癒着

表 1

実験No.	癒着スコア	癒着発生率 (%)	備考
1	0.6	35	実施例 1
2	0.7	46	実施例 2
3	1.2	55	実施例 3
4	1.1	61	実施例 4
5	0.9	32	実施例 5
6	1.3	49	実施例 6
7	1.7	85	コントロール

表1より、コントロールの癒着スコア1.7に対し、実施例1～6で得られたシートまたはフィルムのスコアは0.6～1.3であり、水難溶性化したカルボキシメチルセルロースによる癒着防止効果が見出された。

#### 実施例 8 水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの顕微鏡観察

実施例1から4で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを水及び100mM濃度のリン酸緩衝液(pH6.8)により中和した後に約50℃で乾燥した。それぞれにつきデジタルマイクロスコープ(キーエン

ス社製；VH-7000型）を用い観察を行った。その結果、実施例1で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースにのみ繊維状構造またはフィルム状構造が認められた。実施例1で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロース及び対照として実施例3で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの図（写真）を示す。

得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを蒸留水中でマイクロホモジナイザー（NISSEI EXCEL AUTO HOMOGENIZER）での破碎によりスラリーとした後、印刷用スクリーン上に展開し乾燥してフィルム状とした。図1の実施例1で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースでは均一なフィルムが得られたのに対し、図2の様に他の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースではフィルムが不均一となった。

#### 実施例 9

実施例1で用いたカルボキシメチルセルロースを蒸留水に1質量%になるように溶解した。こうして調製された水溶液のpHを1N硝酸で1.5に調整し、酸性水溶液15mlを30mlのポリスチレン製容器に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。5日間放置した後、25℃で解凍した。その後水及び100mM濃度のリン酸緩衝液（pH6.8）により中和を行い、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。

#### 実施例 10

25℃での1%粘度1000～2800mPa・sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.65～0.95、換算分子量約 $3.0 \times 10^5$ ダルトン、ハーキュレス社製）を蒸留水に1質量%になるように溶解した。こうして調製された水溶液のpHを1N硝酸で1.5に調整し、酸性水溶液15mlを30mlのポリスチレン製容器に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。1日間放置した後、25℃で解凍した。その後水及び100mM濃度のリン酸緩衝液（pH6.8）により中和を行い、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。

#### 実施例 11

実施例 10 における  $-20^{\circ}\text{C}$  での放置期間を 3 日間とし、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。

#### 比較例 1

実施例 1 においてカルボキシメチルセルロースの水溶液を酸性化することなく放置した。その結果、水難溶性化したカルボキシメチルセルロースは得られなかった。この水溶液を凍結乾燥しスポンジ状とした。

#### 比較例 2

実施例 10 においてカルボキシメチルセルロースの水溶液を酸性化することなく放置した。その結果水難溶性化したカルボキシメチルセルロースは得られなかった。この水溶液を凍結乾燥しスポンジ状とした。

実施例 12 水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの溶解性試験  
次の組成からなる pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水を調製した。

#### リン酸緩衝生理食塩水

塩化カリウム	0.02 質量%
リン酸一カリウム	0.02 質量%
リン酸二ナトリウム 12 水和物	0.29 質量%
塩化ナトリウム	0.81 質量%

得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを、乾燥重量で 50 mg のカルボキシメチルセルロースを含む水難溶性化したカルボキシメチルセルロースに対して 50 ml のリン酸緩衝生理食塩水の割合で、リン酸緩衝生理食塩水中に浸漬した。また、比較例 1 及び比較例 2 で得られたスポンジ状カルボキシメチルセルロースについても、それぞれ 50 mg を 50 ml のリン酸緩衝生理食塩水の割合で、リン酸緩衝生理食塩水中に浸漬した。60 $^{\circ}\text{C}$  の静置下でリン酸緩衝生理食塩水中に溶出するカルボキシメチルセルロースの割合を、リン酸緩衝生理食塩水中のカルボキシメチルセルロース濃度から求めた。

従って、中性の 60 $^{\circ}\text{C}$  の水溶液中での水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの溶解性は、上記試験により規定されるものである。

## カルボキシメチルセルロース濃度の測定

リン酸緩衝生理食塩水中のカルボキシメチルセルロースの濃度は、GPCを使って、示差屈折率検出器のピーク面積から求めた。すなわち経時的に採取したリン酸緩衝生理食塩水を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過後GPCに注入した。

その結果を表2に示す。

表 2

実験No.	カルボキシメチルセルロース溶解率 (%)			備考
	3 時間	5 時間	1 0 時間	
8	2 4	3 5	5 5	実施例 1
9	2 0	3 2	6 0	実施例 2
1 0	2 7	4 0	6 3	実施例 3
1 1	3 3	4 8	7 0	実施例 4
1 2	3 9	5 1	6 9	実施例 5
1 3	2 5	3 9	5 9	実施例 6
1 4	1 8	2 4	4 7	実施例 9
1 5	2 5	3 5	5 3	実施例 1 0
1 6	2	8	1 4	実施例 1 1
1 7	9 5	1 0 0		比較例 1
1 8	9 0	1 0 0		比較例 2

例えば、実験No. 8の実施例 1 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースについては、カルボキシメチルセルロースの溶解率が3時間後では24%、5時間後では35%、10時間後では55%であった。すなわち3時間後においては76%が、5時間後においても65%が水難溶性化したカルボキシメチルセルロースとして残存していた。他の実施例で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースについても同様であり、いずれ

の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースも溶解性試験において3時間後のカルボキシメチルセルロースの溶解率が50%以下であった。

これに対し、水難溶性化したカルボキシメチルセルロースが得られなかった比較例1及び比較例2においては、3時間後のカルボキシメチルセルロースの溶解率は90%以上であった。

さらに、実験 No. 8 と実験 No. 14 の比較、実験 No. 15 と実験 No. 16 の比較、あるいは実験 No. 8 と実験 No. 15 の比較、実験 No. 14 と実験 No. 16 の比較から、酸性条件下で凍結解凍することにより得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースについては、選択する調製条件により溶解性が制御できることが明らかとなった。

#### 実施例 13

実施例 10 における  $-20^{\circ}\text{C}$  での放置期間を1日間とし、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。この水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを凍結乾燥することにより約  $2.0\text{ mg/cm}^2$  を含むシート状とした。

#### 実施例 14

実施例 13 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースシートに対しコバルト 60 を放射線源とする  $25\text{ kGy}$  の  $\gamma$  線滅菌を行った。

#### 実施例 15

実施例 10 における  $-20^{\circ}\text{C}$  での放置期間を7日間とし、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを得た。この水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを凍結乾燥することにより約  $2.0\text{ mg/cm}^2$  を含むシート状とした後、コバルト 60 を放射線源とする  $25\text{ kGy}$  の  $\gamma$  線滅菌を行った。

#### 実施例 16

実施例 10 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを凍結乾燥することにより約  $2.0\text{ mg/cm}^2$  を含むシート状とした後、コバルト 60 を放射線源とする  $25\text{ kGy}$  の  $\gamma$  線滅菌を行った。

## 実施例 1 7

実施例 1 1 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを凍結乾燥することにより約  $2.0 \text{ mg/cm}^2$  を含むシート状とした後、コバルト 60 を放射線源とする  $25 \text{ kGy}$  の  $\gamma$  線滅菌を行った。

実施例 1 8  $\gamma$  線滅菌を行った水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの溶解性試験

実施例 1 2 に従い、実施例 1 3 ～ 1 6 で得られた  $\gamma$  線滅菌を行った水難溶性化したカルボキシメチルセルロースシートの溶解性試験を行った。結果を表 3 に示す。

表 3

実験No.	カルボキシメチルセルロース溶解率 (%)			備考
	3 時間	5 時間	1 0 時間	
1 9	2 0	3 3	6 1	実施例 1 3
2 0	8 0	9 5	1 0 0	実施例 1 4
2 1	7	1 1	2 1	実施例 1 5
2 2	4 4	5 8	7 0	実施例 1 6
2 3	2 5	4 2	6 3	実施例 1 7

実験 No. 1 9 と実験 No. 2 0 の比較から、 $\gamma$  線滅菌により溶解性が変化することが明らかとなった。しかしながら、実験 No. 2 0 から実験 No. 2 3 の結果に示されるように、酸性条件下での凍結解凍法において凍結時間を変化させてあらかじめより安定な水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを製造しておき、溶解性を制御することも可能であることが判明した。

## 実施例 1 9

実施例 1 1 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースに蒸留水をカルボキシメチルセルロース濃度が 1 質量%となるように加えた後、マイクロホモジナイザー (NISSEI EXCEL AUTO HOMOGENIZAER) による

破碎を行い、水難溶性化したカルボキシメチルセルロースのスラリーを得た。このスラリーを印刷用スクリーン上に展開し、約40℃での乾燥により水難溶性化したカルボキシメチルセルロース約2.0 mg/cm<sup>2</sup>を含むフィルム状とした。さらにこのフィルムに対し、コバルト60を放射線源とする25 kGyのγ線滅菌を行った。

#### 実施例20 凍結解凍法により得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの癒着防止試験

実施例7に従い、実施例13、実施例16及び実施例19で得られたシートまたはフィルムにつき癒着防止試験を行った。なお、対照として、市販されているセプラフィルム（ジェンザイム社製）を用いた。結果を表4に示す

表4

実験No.	癒着スコア	癒着発生率 (%)	備考
24	0.5	25	実施例13
25	0.6	33	実施例16
26	0.4	16	実施例19
27	1.2	45	セプラフィルム
28	1.6	88	コントロール

表4より、コントロールの癒着スコア1.6に対し、本発明で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースに癒着防止効果が見出された。

#### 実施例21 ラット皮膚欠損モデルによる創傷治療効果試験

7週齢（約200g）のウイスター（Wister）系、雄性ラットの背部の毛を刈り、エーテル麻酔下で眼科用ハサミを用いて背部皮膚部分を直径2cmの円状に取り除き、完全皮膚欠損創を作製した。医療用不織布ガーゼ（40×40mm：2枚重ね）のみを適用した無処置群、実施例1、実施例9、実施例15、実施例17、実施例19及び比較例2で調製したシートまたはフィルム（30×30mm）を創面に被覆後、医療用不織布ガーゼ（40×40



mm: 2枚重ね)を適用した処置群を設定した。各群6匹のラットを用いた。医療用不織布ガーゼは粘着包帯で固定し、さらにテーピングテープで固定した。

治療効果は、創面積の経時的変化を測定することで比較した。すなわち、初期創面の面積に対する面積比を次の式によって求め、その経時的変化を調べた。その結果を表5に示す。

面積比 (%)

$$= \left[ (\text{観察日の創面の長径} \times \text{短径}) / (\text{初期創面の長径} \times \text{短径}) \right] \times 100$$

表 5

実験No.	面積比 (%)					備考
	0日	2日	3日	7日	10日	
29	100	90	78	53	42	実施例1
30	100	85	74	49	37	実施例9
31	100	85	72	40	31	実施例15
32	100	88	76	39	34	実施例19
33	100	91	80	62	55	比較例2
34	100	92	83	69	61	コントロール

表5より、コントロールの面積比の経時的変化に対し、本発明で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースによる経時変化は大きく、創傷治癒効果が確認された。なお、比較例2で得られたカルボキシメチルセルロースのスポンジによる面積比の変化はコントロールと比較して幾分大きかったが、水難溶性化したカルボキシメチルセルロースによる変化に比べて小さく、創傷治癒効果は弱いものと考えられた。

#### 実施例22

実施例15で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを凍結乾燥することにより5.0mg/cm<sup>2</sup>を含むシート状とした。

#### 実施例23

実施例 15 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロースに生理食塩水をカルボキシメチルセルロース濃度が 1 質量%となるように加えた後、マイクロホモジナイザー (NISSEI EXCEL AUTO HOMOGENIZAER) による破碎を行い、水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを約 3 質量%含むスラリーを得た。

#### 実施例 24 水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの家兎頭蓋骨欠損モデルによる骨修復

実施例 22 及び実施例 23 で得られたシート状 (直径 1 cm、高さ 3 mm) 及びスラリー状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロースについて、以下の試験に供した。またコントロールとして、生理食塩水のみを投与する無処置群を設定した。

##### 治療効果試験

日本白色種家兎 (約 2.5 kg) 15 羽をそれぞれ 5 羽ずつ 3 群に分け、実施例 22 のシート状水難溶性化したカルボキシメチルセルロース適用群、実施例 23 のスラリー適用群、及び無処置群とした。埋め込みは、家兎の頭部の毛を刈り、エーテル麻酔下で頭蓋骨にマイクロドリルを用い骨欠損部 (直径 5 mm) を作製し、各種水難溶性化したカルボキシメチルセルロースを骨欠損部に充填し縫合することにより行った。

埋め込みから 9 週後に、難溶解性ヒアルロン酸埋め込み家兎と、凍結乾燥ヒアルロン酸埋め込み家兎をと殺後、頭部を切開し、埋め込み部の状態の観察を行い、骨欠損部 (直径 5 mm) が再生され、頭蓋骨が結合されたものを修復したとした。水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの残存率を埋め込んだ適用物中のカルボキシメチルセルロースを基準として算出し、埋め込み部の状態の観察を併せて行った。結果を表 6 に示す。

表 6

実験No.	骨修復の割合	備考
3 5	4 / 5	実施例 2 2
3 6	4 / 5	実施例 2 3
3 7	1 / 5	無処置群

表 6 より、どの家兎も正常に生育したが、組織の状態は水難溶性化したカルボキシメチルセルロースでは埋め込み局所の組織状態に異常は見られなかったのに対し、無処置群では組織の軽微な炎症が認められた。また水難溶性化したカルボキシメチルセルロース適用群では骨修復の促進が確認された。

#### 実施例 2 5

実施例 1 で用いたカルボキシメチルセルロースと分子量が約  $3.5 \times 10^4$  ダルトンのコンドロイチン-6-硫酸（生化学工業製）を蒸留水にそれぞれ 0.5 質量% になるように溶解した。調製された水溶液の pH を、1 N 硝酸で pH 1.5 に調整し、この酸性水溶液 15 ml を 30 ml のポリスチレン製容器に入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$  に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、 $25^{\circ}\text{C}$  で解凍した。その後水及び 100 mM 濃度のリン酸緩衝液（pH 6.8）により中和を行い、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロース組成物を得た。

#### 実施例 2 6

実施例 10 で用いたカルボキシメチルセルロースとポリビニルアルコール（重合度 1500、和光純薬製）を蒸留水にそれぞれ 0.5 質量% 及び 10 質量% となるように溶解した。調製された水溶液の pH を、1 N 硝酸で p

H 1. 5 に調整し、この酸性水溶液 1 5 m l を 3 0 m l のポリスチレン製容器に入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$  に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、 $25^{\circ}\text{C}$  で解凍した。その後水及び 1 0 0 m M 濃度のリン酸緩衝液 (p H 6. 8) により中和を行い、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロース組成物を得た。

#### 実施例 2 7

実施例 1 0 で用いたカルボキシメチルセルロースとアルギン酸ナトリウム (フナコシ社製) を蒸留水にそれぞれ 0. 5 質量% になるように溶解した。調製された水溶液の p H を、1 N 硝酸で p H 1. 5 に調整し、この酸性水溶液 1 5 m l を 3 0 m l のポリスチレン製容器に入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$  に設定した冷凍庫に入れた。7 日間放置した後、 $25^{\circ}\text{C}$  で解凍した。その後水及び 1 0 0 m M 濃度のリン酸緩衝液 (p H 6. 8) により中和を行い、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロース組成物を得た。

#### 実施例 2 8

実施例 1 0 で用いたカルボキシメチルセルロースとキトサン (和光純薬製) を蒸留水にそれぞれ 1. 0 質量%、0. 1 質量% となるように溶解した。調製された水溶液の p H を、1 N 硝酸で p H 1. 5 に調整し、この酸性水溶液 1 5 m l を 3 0 m l のポリスチレン製容器に入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$  に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、 $25^{\circ}\text{C}$  で解凍した。その後水及び 1 0 0 m M 濃度のリン酸緩衝液 (p H 6. 8) により中和を行い、スポンジ状の水難溶性化したカルボキシメチルセルロース組成物を得た。

#### 実施例 2 9 水難溶性化したカルボキシメチルセルロースの細胞毒性試験

実施例 1 ~ 実施例 6、実施例 9、実施例 1 1 及び実施例 1 4 ~ 実施例 1 7 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロース、ならびに実施例 2 5 ~ 実施例 2 8 で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロース組成物について細胞毒性試験を行った。

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞培養において本発明で得られた水難溶性化

したカルボキシメチルセルロース類を非接触下で共存させ、細胞増殖挙動の観察によりその細胞毒性を評価した。調製品をリン酸緩衝生理食塩水に浸漬したのち凍結乾燥体とした。その凍結乾燥体を機械的に粉碎したもの20mgをファルコン社製のセルカルチャーインサート（ポアサイズ：3  $\mu$ m）中に入れ、細胞を播種した培地に浸した。また、水難溶性化したカルボキシメチルセルロース非共存下での培養をコントロールとした。

培養条件 プレート：細胞培養用12ウェルプレート

培地：DMEM培地＋10%ウシ胎児血清，2ml／ウェル

温度：37℃（5%CO<sub>2</sub>下）

播種細胞数：1×10<sup>4</sup>個／ウェル

培養開始後2日、5日及び8日後に、細胞密度を倒立顕微鏡を用いて観察した。水難溶性化したカルボキシメチルセルロースが共存していてもコントロールと同様に良好な増殖を示し、本発明で得られた水難溶性化したカルボキシメチルセルロース及びその組成物には細胞毒性作用がないことが見出された。

#### 産業上の利用可能性

以上、本発明によれば、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、可溶性セルロース誘導体からなる水難水溶性化した可溶性セルロース誘導体を得られる。化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することに起因する生体適合性への悪影響が避けられ、また溶解性の制御が容易なため医用材料に有用である。

## 請求の範囲

1. 水難溶性化した可溶性セルロース誘導体からなる、体内へ埋め込む又は組織に貼付する目的で使用するための組織被覆性医療材料。
2. 水難溶性化する方法として、可溶性セルロース誘導体の酸性溶液の凍結・解凍を用いることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料の製造方法。
3. 可溶性セルロース誘導体濃度を5質量%以上になるように酸溶液と混和し、非凍結温度下で放置することにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料。
4. 可溶性セルロース誘導体の酸性溶液を静置することにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料。
5. 可溶性セルロース誘導体の酸性溶液と極性有機溶媒を混合することにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料。
6. 陽イオン交換カラムに可溶性セルロース誘導体溶液を通液させることにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料。
7. 可溶性セルロース誘導体の酸性溶液を濃縮することにより得られる水難溶性化した可溶性セルロース誘導体を用いることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料。
8. 可溶性セルロース誘導体からなり、実質的には化学的架橋剤または化学的修飾剤等により改質されていない請求の範囲1記載の水難溶性化した可溶性セルロース誘導体。
9. 水難溶性化した可溶性セルロース誘導体が繊維状構造またはフィルム状構造を有することを特徴とする請求の範囲1又は2記載の組織被覆性医療

材料。

10. 中性の60℃の水溶液中で3時間での可溶性セルロース誘導体の溶解率が50%以下であることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料。

11. 水難溶性化した可溶性セルロース誘導体の溶解性を制御することを特徴とする請求の範囲2記載の組織被覆性医療材料の製造方法。

12. 水難溶性化した可溶性セルロース誘導体とヒアルロン酸又はヒアルロン酸塩を除く他の高分子からなることを特徴とする請求の範囲1記載の組織被覆性医療材料。

13. 可溶性セルロース誘導体がカルボキシメチルセルロースである請求の範囲1～12のいずれか1項記載の可溶性セルロース誘導体。

14. 組織被覆性医療材料が癒着防止材であることを特徴とする請求の範囲1又は12記載の組織被覆性医療材料。

15. 組織被覆性医療材料が創傷被覆材であることを特徴とする請求の範囲1又は12記載の組織被覆性医療材料。

16. 組織被覆性医療材料が骨再生用被覆材であることを特徴とする請求の範囲1又は12記載の組織被覆性医療材料。

図 1

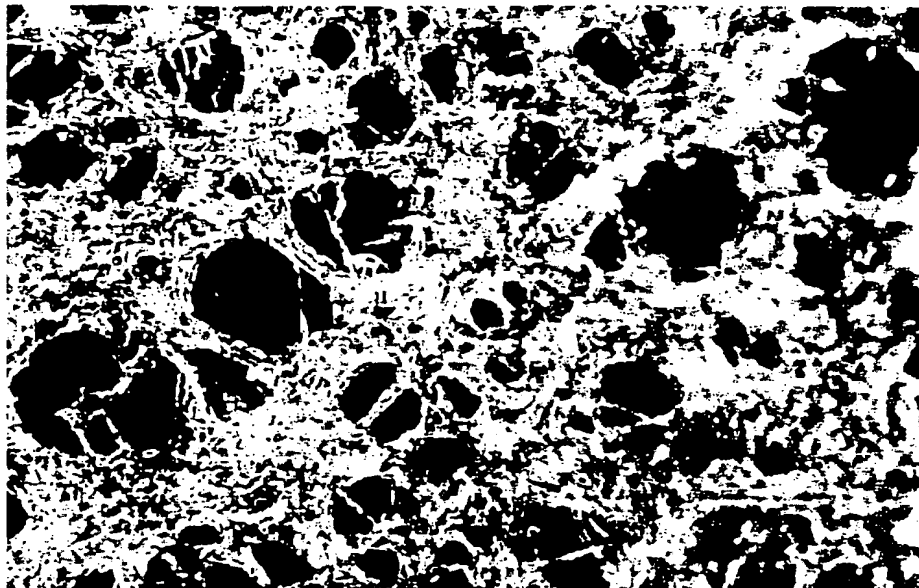


図 2



1/1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> A61L15/00, 27/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61L15/00, 27/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN) , MEDLINE (STN) , EMBASE (STN) , BIOSIS (STN) , BIOTECHABS (STN) , JICST (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 62-183768, A (Terumo Corporation), 12 August, 1987 (12.08.87), Claims; page 3, upper right column to lower right column; example; Effects of the Invention (Family: none)	1-11, 13-16  12
X	US, 5017229, A (Genzyme Corporation), 21 May, 1991 (21.05.91), Claims; example & JP, 5-508161, A Claims; example & WO, 92/00105, A & AU, 9183924, A & FI, 9205802, A & NO, 9204875, A & EP, 537292, A1	1-16
X	WO, 92/20349, A1 (GENZYME CORPORATION), 26 November, 1992 (26.11.92), Claims; example; page 9, line 5 to page 16, line 22 & JP, 6-508169, A	1-16
A	Claims; example; page 7, lower left column to page 9, lower right column & AU, 9221434, A & EP, 587715, A1	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 November, 2000 (08.11.00)		Date of mailing of the international search report 28 November, 2000 (28.11.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05564

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& US, 5760200, A & US, 6030958, A	
X	JP, 7-179649, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 18 July, 1995 (18.07.95),	1-11,14-15
A	Claims; example; Par. No. [0010] (Family: none).	12,13,16
X	EP, 705878, A2 (GENZYME CORPORATION), 10 April, 1996 (10.04.96),	1-16
A	Claims; example; page 3, lines 12 to 26; page 5, lines 41 to 48 & JP, 8-208706, A Claims; example; Par. Nos. [0013] to [0014], [0042] to [0044] & AU, 9532860, A & CA, 2159055	
X	US, 5906997, A (Fzio Med, Inc.), 25 May, 1999 (25.05.99),	1-16
A	Claims; example & WO, 98/58011, A1 & AU, 9876985, A & EP, 1002002, A1 & US, 6017301, A & US, 6133325, A	
X	US, 2617800, A (Phillips Petroleum Company), 11 November, 1952 (11.11.52),	8,13
A	Full text (Family: none)	1-7,9-12, 14-16
X	HAKERT, H., et al., "Rheological and electron microscopic characterization of aqueous carboxymethyl cellulose gels Part I: Rheological aging of aqueous gels of carboxymethyl cellulose in the free acid form (HCMC)", Colloid & Polym. Sci., 267, pp.226-229 (1989)	8,13
A		1-12,14-16
X	MUELLER, T., et al., "Rheological and electron microscopic characterization of aqueous carboxymethyl cellulose gels Part II: Visualization of the gel structure by freeze-fracturing", Colloid & Polym. Sci., 267, pp.230-236 (1989)	8,13
A		1-7,9-12, 14-16
PX	JP, 2000-178304, A (Denki Kagaku Kogyo K. K.), 27 June, 2000 (27.06.00), Full text (Family: none)	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05564

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 13  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See extra sheet.)
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05564

Continuation of Box No.I-2. of continuation of first sheet (1)

Although the invention as set forth in claim 13 is described by citing a number of claims, the claims cited therein pertain to a medical material for coating tissues, a process for producing this material and a soluble cellulose derivative having been made hardly soluble in water. Thus, the subject of the invention as set forth in claim 13 is unclear.

In this report, therefore, international search has been practiced by considering it as an invention pertaining to carboxymethylcellulose having been made hardly soluble in water per se.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/05564

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A61L15/00, 27/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A61L15/00, 27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),  
BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 62-183768, A (テルモ株式会社), 12. 8月. 1987 (12. 08. 87),	1-11, 13-16
A	特許請求の範囲, 第3頁右上欄-右下欄, 実施例, 発明の効果 (ファミリーなし)	12
X	US, 5017229, A (Genzyme Corporation), 21. 5月. 1991 (21. 05. 91), 特許請求の範囲, 実施例, & JP, 5-508161, A, 特許請求の範囲, 実 施例, & WO, 92/00105, A, & AU, 9183924, A, & FI, 9205802, A, & NO, 9204875, A, & EP, 537292, A1	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 11. 00

国際調査報告の発送日

28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲 英 子 印

4C

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 92/20349, A1 (GENZYME CORPORATION), 26. 11月. 1992 (26. 11. 92), 特許請求の範囲, 実施例, 第9頁5行-第16頁22行, & JP, 6-508169, A, 特許請求の範囲, 実施例, 第7頁左下欄-第9 頁右下欄, & AU, 9221434, A, & EP, 587715, A1, & US, 5760200, A, & US, 6030958, A	1-16
X A	JP, 7-179649, A (雪印乳業株式会社), 18. 7月. 1995 (18. 07. 95), 特許請求の範囲, 実施例, 【0010】 (ファミリーなし)	1-11, 14-15 12, 13, 16
X A	EP, 705878, A2 (GENZYME CORPORATION), 10. 4月. 1996 (10. 04. 96), 特許請求の範囲, 実施例, 第3頁12-26行, 第5頁41-48行, & JP, 8-208706, A, 特許請求の範囲, 実施例, [0013]-[0014], [0042]-[0044], & AU, 9532860, A, & CA, 2159055	1-16
X A	US, 5906997, A (Fzio Med, Inc.), 25. 5月. 1999 (25. 05. 99), 特許請求の範囲, 実施例, & WO, 98/58011, A1, & AU, 9876985, A, & EP, 1002002, A1, & US, 6017301, A, & US, 6133325, A	1-16
X A	US, 2617800, A (Phillips Petroleum Company), 11. 11月. 1952 (11. 11. 52), 全文参照 (ファミリーなし)	8, 13 1-7, 9-12, 14-16
X A	HAKERT, H., <i>et al.</i> , "Rheological and electron microscopic characterization of aqueous carboxymethyl cellulose gels Part I: Rheological aging of aqueous gels of carboxymethyl cellulose in the free acid form (HMC)", Colloid & Polym. Sci., 267, pp. 226-229 (1989)	8, 13 1-12, 14-16
X A	MUELLER, T., <i>et al.</i> , "Rheological and electron microscopic characterization of aqueous carboxymethyl cellulose gels Part II: Visualization of the gel structure by freeze- fracturing", Colloid & Polym. Sci., 267, pp. 230-236 (1989)	8, 13 1-7, 9-12, 14-16
PX	JP, 2000-178304, A (電気化学工業株式会社), 27. 6月. 2000 (27. 06. 00), 全文参照 (ファミリーなし)	1-16

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 13 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
  
(別紙参照のこと。)
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第 I 欄 2. の続き)

○請求の範囲 1 3 について

請求の範囲 1 3 に係る発明は多数の請求項を引用する記載となっているが、引用する請求の範囲に記載されているものは組織被覆性医療材料、同材料の製造方法及び水難溶性化した可溶性セルロース誘導体であるために、請求の範囲 1 3 に係る発明の対象が不明瞭になっている。

したがって本報告では、水難溶性化したカルボキシメチルセルロース自体の発明とみなして国際調査を行った。